

**Verfahren und Vorrichtungen zur Untersuchung eines
deformierbaren Objekts**

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Untersuchung eines in einer Flüssigkeit suspendierten, deformierbaren Objekts, insbesondere zur Untersuchung von Deformationseigenschaften von biologischen Partikeln, wie zum Beispiel von biologischen Zellen, mit den Merkmalen der Oberbegriffs von Patentanspruch 1. Die Erfindung betrifft auch Vorrichtungen zur Umsetzung derartiger Verfahren und Anwendungen von Hochfrequenz-Feldkäfigen in fluidischen Mikrosystemen.

15 Es ist bekannt, dass geschädigte, transformierte oder entartete biologische Zellen häufig gegenüber gesunden Zellen abweichende mechanische Eigenschaften aufweisen, wobei sie üblicherweise weicher als gesunde Zellen sind (siehe B. Alberts et al. in "Lehrbuch der molekularen Zellbiologie", Wiley VCH, Weinheim, 1998; und J. M. Vasiliev et al. in "BBA" Bd. 780, 20 1985, S 21-65 "Spreading of non-transformed and transformed cells"). Außerdem unterscheiden sich verschiedene Zelltypen, wie zum Beispiel weiße und rote Blutzellen nach ihrer Verformbarkeit (siehe R. Glaser in „Biophysik“, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996). Es wurde weiterhin festgestellt, dass Krebszellen zwischen 2- und 10-fach weicher als gesunde Zellen sein können und sich unter dem Einfluss von Kräften deutlich stärker als gesunde Zellen verformen (siehe J. Guck et al. in "Biophysical Journal", Bd. 81, 2001, S. 767 25 - 784). Es ist bekannt, dass sich das Zytoskelett und damit die viskoelastischen Eigenschaften von Zellen durch die Zugabe von bestimmten Agenzien, z. B. Cytochalasin oder Colchizin verändern lassen (siehe B. Alberts et al.). B. Alberts et al.

30

beschreiben auch, dass sich das Zytoskelett während der Zellontogenese/-differenzierung und des Zellzyklus ändert.

Ein Beispiel für geschädigte biologische Zellen, deren mechanische Eigenschaften sich durch die Schädigung ändern, sind bei Malaria durch Parasitenbefall geschädigte rote Blutkörperchen (siehe F.K. Glenister et al. in „Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells“, BLOOD, Bd. 99, Nr. 3, 2002, S. 1060 bis 1063).

Zur Unterscheidung von Krebszellen und gesunden Zellen wird von J. Guck et al. und in US 6 067 859 ein optischer Mikromanipulator vorgeschlagen, der als so genannter optischer Strecker (oder: Laserstrecker) wirkt. Der optische Strecker verwendet zwei gegenläufige, kaum fokussierte Laserstrahlen, um Zellen, die in einer Flüssigkeit suspendiert sind, im Durchfluss bei niedriger Lichtleistung (10 - 100 mW) einzufangen. Wenn die Lichtleistung erhöht wird (100 mW - 1.5 W), werden die Zellen je nach Zelltyp unterschiedlich stark verzerrt (deformiert). Gesunde Zelle ändern sich kaum, während sich Tumorzellen deutlich verformen.

Die Verwendung des optischen Streckers zur Erkennung von Krebszellen besitzt mehrere Nachteile. Ein Hauptnachteil besteht darin, dass der optische Strecker nur mit einzelnen Zellen sicher funktionieren kann, wobei jedoch keine Möglichkeit zur Selektion einzelner Zellen aus der Suspensionsflüssigkeit gegeben ist. Mehrere, zwischen den Laserstrahlen gefangene Zellen treten miteinander in Wechselwirkung, so dass die zu untersuchende Deformation beeinflusst wird. Zur Vermeidung dieses Problems muss mit extrem verdünnten Proben gearbeitet werden. Dadurch wird der Probendurchsatz beschränkt. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die De-

tektion der Deformation nicht zuverlässig automatisierbar ist. Schließlich besteht ein Nachteil des Laserstreckers auch darin, dass der Fangbereich aufgrund des geringen Durchmessers des Lichtleiters zur Einkopplung der Laserstrahlen nur
5 eine geringe Größe von z. B. 5 µm besitzt.

In der Publikation "Reversible Electroporabilization of mammalian cells by high-intensity, ultra-short pulses of sub-microsecond duration" von K. J. Müller et al. ("J. Membrane
10 Biol." Bd. 184, 2001, S. 161-170) wird beschrieben, dass in einer Flüssigkeit suspendierte Zellen in elektrischen Gleich- oder Wechselspannungsfeldern (E) deformiert werden können. In Abhängigkeit von den elektrischen Leitfähigkeiten σ der Suspensionsflüssigkeit (Index 1) und des Zellzytosol (Index
15 c) können sowohl elongierende als auch komprimierende Drücke P_D ausgeübt werden (siehe Fig. 6). Für hochfrequente Felder ergibt sich für den Druck (Stress) P_D (ϵ_0 : absolute Dielektrizitätskonstante, ϵ_1 : relative Dielektrizitätskonstante der Suspensionsflüssigkeit, Θ : Winkel zwischen dem elektrischen
20 Feld und der betrachteten Wirkungsrichtung des Druckes):

$$P_D = \frac{9}{2} \epsilon_0 \epsilon_1 E^2 \cos^2[\Theta] \frac{\sigma_c^2 - \sigma_l^2}{(\sigma_c + 2\sigma_l)^2} \quad (1)$$

Die von K. J. Müller et al. beschriebene Deformation von Zellen dient der Beeinflussung der Durchlässigkeit der Zellmembran bei der so genannten Elektroporabilisierung. Aus dem
25 folgenden Grund ist diese Deformationstechnik für die o. g. Erkennung gesunder oder kranker Zellen ungeeignet. In Abhängigkeit von den mechanischen und dielektrischen Eigenschaften
30 der Zellen werden zur Deformation Feldstärken von einigen 10 kV/m bis in den MV/m-Bereich benötigt. Aufgrund der hohen Feldstärken wird nur in Lösungen niedriger Leitfähigkeit gearbeitet, um Ohm'sche Verluste zu vermeiden. Dabei werden die

Zellen über positive Dielektrophorese zusätzlich an die Elektroden zur Erzeugung der Gleich- oder Wechselspannungsfelder gezogen, so dass zwischen den Zellen und den Elektroden Wechselwirkungen auftreten, die eine reproduzierbare und quantitative Beobachtung der Deformation erschweren. Durch einen Elektrodenkontakt der Zelle wird deren Vitalität beeinflusst und die Zelle lässt sich oft nicht oder nicht zerstörungsfrei von den Elektroden ablösen.

- 10 Die Anwendung hochfrequenter elektrischer Felder zur Untersuchung der viskoelastischen Eigenschaften von Erythrozyten wird von H. Engelhardt et al. in: „Nature“, Bd. 307, 1984, S. 378-380, „Viscoelastic properties of erythrocyte membranes in high-frequency electric fields“ beschrieben. In einer Küvette
- 15 werden scharfkantige Elektroden mit einem Abstand von 50 µm angeordnet. Bei Beaufschlagung der Elektroden mit einer hochfrequenten elektrischen Spannung ordnen sich einzelne oder mehrere Erythrozyten zwischen den Elektroden an. Die Erythrozyten werden zu den Elektroden gezogen. Durch eine kurzzeitige Feldstärkenerhöhung erfolgt eine Deformation, die optisch beobachtet und quantitativ ausgewertet werden kann. Die von
- 20 H. Engelhardt beschriebene Technik besitzt mehrere Nachteile. Ein wesentliches Problem besteht darin, dass wie bei der oben beschriebenen Technik von K. J. Müller et al. die Erythrozyten die Elektroden berühren. Dadurch wird die Beobachtung der Deformation verfälscht. Außerdem können die Erythrozyten nicht in definierter Weise in verschiedenen Richtungen deformiert werden. Ein weiteres Problem besteht darin, dass bei
- 25 den von H. Engelhardt et al. vorgeschlagenen Versuchsbedingungen mit einer extrem niedrigen Leitfähigkeit der Pufferlösung gearbeitet werden muss, die die Erythrozyten umgibt. Die Leitfähigkeit der Pufferlösung liegt im Bereich von 1 mS/m bis 10 mS/m. Diese Leitfähigkeiten liegen jedoch erheblich
- 30 unter den Leitfähigkeiten physiologischer Lösungen, so dass

die untersuchten Erythrozyten einem zusätzlichen Stress ausgesetzt sind oder zerstört werden können.

Ein weiterer Nachteil der von H. Engelhardt et al. vorgeschlagenen Messung besteht darin, dass lediglich eine integrale Lichtmessung vorgesehen ist. Topographische Deformationsbilder können mit der herkömmlichen Technik nicht aufgenommen werden. Schließlich ist die von H. Engelhardt et al. beschriebene Technik nicht im Durchflusssystem realisierbar und für eine Automatisierung ungeeignet.

Des Weiteren ist bekannt, einzelne Zellen unter der Wirkung hochfrequenter elektrischer Felder in Feldkäfigen mittels negativer Dielektrophorese zu fangen und zu halten. Die Verwendung von Hochfrequenz-Feldkäfigen war bisher auf die möglichst schonende Manipulation der Zellen gerichtet, wobei einseitige Kraftwirkungen oder Deformationen der Zellen gerade unerwünscht waren. Beispielsweise beschreiben H. Wissel et al. in "American Journal of Physiology Lung Cell Mol. Physiol." (Bd. 281, 2001, L345-L360 "Endocytosed SP-A and surfactant lipids are sorted to different organelles in rat type II pneumocytes"), dass Zellen auch bei hohen Feldstärken schonend gehalten werden können, da sie sich zum einen in einem Feldminimum (Nullfeld) befinden und zum anderen das Heizen minimierende Mikroelektroden Verwendung finden.

T. Schnelle et al. beschreiben in "J. Electrostat." (Bd. 50, 2000, S. 17-29, "Trapping in ac octode field cages") verschiedene Phasensteuerungen dielektrischer Hochfrequenz-Feldkäfige. Durch eine geeignete Ansteuerung können Objekte stabil gehalten oder gezielt in eine Richtung aus dem Feldkäfig entlassen oder Bedingungen gefunden werden, unter denen mehrere Objekte im Käfig miteinander in Kontakt gebracht werden.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, verbesserte Verfahren zur Untersuchung von Deformationseigenschaften von Objekten, insbesondere von biologischen Zellen bereitzustellen, mit denen
5 die Nachteile der herkömmlichen Verfahren überwunden werden und die insbesondere eine Charakterisierung von Deformationseigenschaften mit erhöhter Genauigkeit und Reproduzierbarkeit ermöglichen. Erfindungsgemäße Verfahren sollen des Weiteren eine quantitative Charakterisierung der Deformationseigen-
10 schaften ermöglichen und mit vermindertem gerätetechnischen Aufwand automatisierbar sein. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, verbesserte Vorrichtungen zur Untersuchung von Deformationseigenschaften von Objekten, insbesondere zur Umsetzung der erfindungsgemäßen Verfahren bereitzustellen.

15 Diese Aufgaben werden mit Verfahren und Vorrichtungen mit den Merkmalen der Patentansprüche 1 und 25 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

20 Verfahrensbezogen beruht die Erfindung auf der allgemeinen technischen Lehre, zur Untersuchung eines in einer Flüssigkeit suspendierten Objekts nach dessen Positionierung in einem Potentialminimum eines hochfrequenten elektrischen Positionierungs-Feldes in einem Untersuchungsbereich eines fluidischen Mikrosystems auf das Objekt mit einem Deformations-Feld eine Deformationskraft auszuüben und eine Reaktion des Objekts auf die Deformationskraft durch eine Detektion mindestens einer Eigenschaft aus der Gruppe der elektrischen,
25 geometrischen und optischen Eigenschaften des Objekts zu erfassen. Vorteilhafterweise ermöglicht die Verwendung des hochfrequenten elektrischen Positionierungs-Feldes eine berührungslose, dielektrische Positionierung einzelner Objekte mit hoher Stabilität und Ortsgenauigkeit. Die berührungslose
30

Positionierung umfasst eine Halterung einzelner Objekte, wie z. B. einzelner biologischer Zellen in frei suspendiertem Zustand, d. h. freischwebend in der Suspensions- oder einer Behandlungsflüssigkeit ohne einen direkten mechanischen Kontakt (ohne eine unmittelbare Berührung) mit Komponenten des fluidischen Mikrosystems. Das zu untersuchende Objekt befindet sich bei der Positionierung und der Deformation in freier Lösung, d. h. es ist allseitig von der Flüssigkeit umgeben, zu allen benachbarten Wandflächen oder Elektroden des Mikrosystems bestehen Abstände. Die Stabilität der Positionierung erlaubt es, dass ein Detektor präzise auf das Objekt justiert und zur Erfassung der gewünschten Eigenschaften eingerichtet werden kann.

Das Deformationsfeld wirkt gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens auf der Grundlage von negativer Dielektrophorese. Die mit der vorliegenden Erfindung erstmalig vorgeschlagene Kombination der Halterung mittels negativer Dielektrophorese mit der Wirkung des Deformationsfeldes besitzt den Vorteil, eine besonders schonende Untersuchung biologischer Objekte in fluidischen Mikrosystemen zu ermöglichen, wie sie an sich zur Manipulierung, Behandlung, Sortierung und Analyse zum Beispiel von biologischen Zellen bereits verfügbar sind.

Vorzugsweise wird ein Fangfeld durch negative Dielektrophorese und alternierend oder gleichzeitig ein Deformationsfeld unter Verwendung positiver oder negativer Dielektrophorese erzeugt, wobei durch diese Kombination aus Fangfeld und Deformationsfeld ein Kontakt der Objekte mit den Elektroden vermieden werden kann.

Die Halterung der Objekte durch negative Dielektrophorese besitzt besondere Vorteile bei der Untersuchung biologischer

Objekte. Die Leitfähigkeit der umgebenden Suspensions- oder Behandlungsflüssigkeit kann bspw. im Vergleich zu der von H. Engelhardt beschriebenen Technik erheblich, insbesondere in den Bereich physiologischer Bedingungen erhöht werden. Die
5 Leitfähigkeit kann z. B. größer als 0.3 S/m und insbesondere entsprechend dem physiologischen Wert 1.5 S/m eingestellt werden. Insbesondere bei der Messung an biologischen Zellen, bei denen die Leitfähigkeit im Inneren der Zelle geringer als im Außenmedium ist, tritt vorteilhafterweise die negative
10 Dielektrophorese im gesamten interessierenden Frequenzbereich insbesondere oberhalb von 1 kHz bis in den GHz-Bereich auf. Im Vergleich zu herkömmlichen Techniken ist für das Deformationsfeld ein vergrößerter Frequenzbereich verfügbar, wobei das Deformationsfeld für negative oder positive dielek-
15 trophoretische Bedingungen erzeugt werden kann und bei verschiedenen Frequenzen verschiedene Deformationswirkungen einstellbar sind. Ein weiterer wichtiger Vorteil der Verwendung einer Suspensions- oder Behandlungsflüssigkeit mit einer erhöhten Außenleitfähigkeit besteht in der Verringerung
20 Ohm'scher Heizwirkungen, z. B. bis zu einem Faktor 5, so dass die Zellphysiologie während der Messung kaum beeinflusst wird.

Gemäß einer alternativen Variante wirkt das Deformationsfeld
25 auf der Grundlage von positiver Dielektrophorese, was für bestimmte Objekte zur berührungslosen Halterung von Vorteil sein kann.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäße
30 Vorrichtung wird vorteilhafterweise generell ein Elektrodenkontakt vermieden. Dadurch wird insbesondere bei der Behandlung von Zellen eine mechanische Beschädigung der Zellen vermieden. Es kann durch eine geeignete zeitliche und geometrische Felddausbildung eine Deformation sowohl in homogenen, als

auch in inhomogenen elektrischen Feldern erfolgen, entsprechend der parallelen oder antiparallelen Polarisierung im externen elektrischen Feld.

5 Welche der elektrischen, geometrischen und/oder optischen Eigenschaften des Objekts detektiert wird, hängt von der konkreten Anwendung der Erfindung ab. Beispielsweise kann durch eine Impedanzmessung im Untersuchungsbereich festgestellt werden, ob und mit welcher Geschwindigkeit sich das Objekt
10 deformiert und ggf. in den undeformierten Zustand relaxiert. Diese Variante kann für den Betrieb automatisierter Mikrosysteme ohne eine optische Prozessbeobachtung von Vorteil sein. Eine Detektion der geometrischen Eigenschaften des Objekts bedeutet entsprechend, dass die äußere Form des Objekts zum
15 Beispiel mit einer Kamera während der Deformation und/oder Relaxation erfasst und anschließend ausgewertet wird. Die Detektion optischer Eigenschaften bezeichnet hier die Erfassung der Wechselwirkung des Objekts mit Licht, wie zum Beispiel eine Fluoreszenzmessung oder eine Streulichtmessung. Wenn die
20 erfindungsgemäße Untersuchung bspw. an biologischen Zellen erfolgt, die auf mechanische Reize durch eine Veränderung der Membranstruktur reagieren und entsprechend Fluoreszenzmarker aktivieren können, umfasst die optische Detektion eine Fluoreszenzmessung während der Deformation und/oder Relaxation.

25

Weitere wichtige Vorteile der erfindungsgemäßen Verfahren bestehen darin, dass sie eine reproduzierbare, quantitative Auswertung der detektierten Eigenschaften zur Ermittlung elastischer Eigenschaften des Objektes wie z. B. der viskoelastischen Eigenschaften biologischer Zellen ermöglichen. Das
30 Verfahren ist vollständig automatisierbar. Die Detektion von Eigenschaften, die für die Deformation oder die Relaxation charakteristisch sind, kann im Echtzeitbetrieb oder nachträglich über gespeicherte Daten (zum Beispiel Videoauf-

zeichnung) mit an sich bekannten Algorithmen der Bildauswertung erfolgen. Es können statische oder dynamische elastische Eigenschaften der zu untersuchenden Objekte ermittelt werden.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren besitzt vorteilhafterweise eine hohe Flexibilität in Bezug auf den Zeitpunkt der Deformationsmessung. Die Detektion kann gemäß bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung einfach oder mehrfach zu Zeitpunkten erfolgen, die im gesamten Zeitbereich während und nach der Deformation des Objekts gewählt sind. Entsprechend kann die Detektion eine Erfassung von Deformationseigenschaften oder bei kurzzeitiger Ausübung der Deformationskräfte von Relaxationseigenschaften des Objekts umfassen. Vorteile in Bezug auf einen erweiterten Informationsgehalt der Detektion können sich ergeben, wenn eine Zeitabhängigkeit der jeweils gemessenen elektrischen, geometrischen und/oder optischen Größe erfasst wird.

10

15

20

25

Besondere Vorteile insbesondere bei der Untersuchung biologischer Proben können sich ergeben, wenn das Positionierungsfeld mit einer Käfig-Elektrodenanordnung als Hochfrequenz-Feldkäfig erzeugt wird, da mit der Gestaltung und der Ansteuerung von an sich bekannten Hochfrequenz-Feldkäfigen bereits Erfahrungen bestehen.

30

Gemäß einer Variante der Erfindung wird der Hochfrequenz-Feldkäfig als allseits geschlossener Feldkäfig mit einem im Wesentlichen punktförmigen, im Mikrosystem ortsfesten Potentialminimum betrieben. Vorteilhafterweise können die Deformation und Detektion am ruhenden Objekt durchgeführt werden. Gemäß einer alternativen Variante der Erfindung wird der Hochfrequenz-Feldkäfig als offener Feldkäfig mit einem linienförmigen Potentialminimum betrieben, das sich in Längs-

richtung eines Kanals im fluidischen Mikrosystem erstreckt. Das Objekt bewegt sich mit der Suspensionsflüssigkeit durch die Käfig-Elektrodenanordnung, wobei der Feldkäfig lediglich für eine Positionierung des Objekts auf einer bestimmten Trajektorie durch den Kanal sorgt. Die Deformation und Detektion können dynamisch am bewegten Objekt durchgeführt werden, so dass die Erfindung auch im laufenden Betrieb von Hochdurchsatzsystemen realisiert werden kann.

10 Vorteilhafterweise kann der technische Aufwand bei der Umsetzung der Erfindung vermindert werden, wenn die zur Bildung des Positionierungs-Feldes vorgesehene Käfig-Elektrodenanordnung auch zur Erzeugung des Deformations-Feldes verwendet wird. Durch ein Umschalten von einem Fang- oder Positioniermodus und zu einem Streck- oder Deformationsmodus können in an sich bekannter Weise dielektrische und/oder optische Eigenschaften und zusätzlich die gewünschten mechanisch-elastischen Eigenschaften des Objektes untersucht werden. Diese Variante ist besonders für Screening-Aufgaben von Vorteil, bei denen die mechanisch-elastischen Eigenschaften des Objektes mit anderen Messparametern in Beziehung gesetzt werden sollen. Alternativ kann eine separate Deformations-Elektrodenanordnung zur Erzeugung des Deformations-Feldes verwendet werden, wobei sich Vorteile für die Steuerung der Positionier- und Deformations-Felder ergeben können.

Wenn das Deformations-Feld gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung für eine Dauer von 1 ms bis 500 ms eingestellt wird, können sich Vorteile in Bezug auf eine relativ geringe mechanische, geringe elektrische und geringe thermische Belastung des Objektes ergeben. Besonders vorteilhaft ist es, wenn die Erzeugung des Deformations-Feldes impulsförmig erfolgt, da in diesem Fall das Zeitverhalten der

Relaxation der Objektdeformation mit erhöhter Genauigkeit erfasst werden kann.

Wenn vor der Erzeugung des Deformations-Feldes eine Behandlungsflüssigkeit in den Untersuchungsbereich geleitet wird, kann vorteilhafterweise ein zeitweiliger Lösungsaustausch erfolgen, beispielsweise um das Deformationsverhalten des Objekts in verschiedenen Medien zu untersuchen oder um zwischen Untersuchungen mit verschiedenen Deformationsrichtungen eine Objektbehandlung mit einer bestimmten Behandlungsflüssigkeit vorzunehmen. Die Positionierung des Objekts erfolgt in diesem Fall vorzugsweise an einer Kanaleinmündung oder -kreuzung im fluidischen Mikrosystem, an der die jeweilige Behandlungsflüssigkeit zugeführt wird.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt an einem bestimmten Objekt, wie zum Beispiel an einer zu untersuchenden biologischen Zelle eine Mehrfachmessung. Hierzu werden die Schritte Erzeugung des Deformations-Feldes und Detektion mehrfach aufeinanderfolgend durchgeführt. Die Mehrfach-Detektion kann beispielsweise darauf gerichtet sein, die Deformation mit identischen Verfahrensbedingungen zu wiederholen, um die Genauigkeit der Messung zu erhöhen. Alternativ oder zusätzlich können die Verfahrensbedingungen, wie zum Beispiel die ausgeübten Kräfte, die Feldstärken, Phasen und/oder Frequenzen der hochfrequenten elektrischen Felder, die Dauer der Krafteinwirkung oder der Zusatz der Behandlungsflüssigkeit variiert werden, um zusätzliche Informationen über das Objekt zu erhalten. Vorteilhafterweise kann insbesondere ein Regelkreis realisiert werden, in dem das Positionierungs-Feld und/oder das Deformations-Feld in Abhängigkeit vom Ergebnis der vorhergehenden Detektion eingestellt wird. Des Weiteren kann bei aufeinanderfolgenden Untersuchungen das Deformations-Feld so eingestellt und/oder

das Objekt so gedreht werden, dass das Objekt in verschiedenen Richtungen deformiert wird. Diese Variante der Erfindung kann Vorteile für die Untersuchung von Objekten mit anisotropen elastischen Eigenschaften besitzen.

5

Wenn die Mehrfachmessung über einen längeren Zeitraum erfolgt, können vorteilhafterweise plastische Verformungen oder die Deformation in Abhängigkeit von der ausgeübten Kraft untersucht werden. Die Dauer der Mehrfachmessung beträgt hierzu vorzugsweise mindestens eine Sekunde.

10

Bei der Umsetzung der Erfindung in der Praxis, insbesondere bei der Untersuchung biologischer Zellen ist bevorzugt, aus den detektierten elektrischen, geometrischen und/oder optischen Eigenschaften elastische Eigenschaften des Objekts zu ermitteln. Als Deformationseigenschaft können beispielsweise eine oder mehrere der folgenden Größen als integrale oder strukturselektive Parameter erfasst werden: Elastizitätsmodul, Schermodul, Viskosität, Federkonstante, Steifigkeitskonstante und Relaxationszeit. Des Weiteren kann eine Anpassung auf der Grundlage an sich bekannter Modelle erfolgen, wie sie bspw. von H. Engelhardt et al. (siehe oben) beschrieben werden. Die Erfindung ist nicht auf die Messung elastischer Eigenschaften beschränkt. Es können auch plastische Deformationseigenschaften oder Zwischenformen zwischen elastischem und plastischem Verhalten ermittelt werden.

15

20

25

30

Weitere Vorteile bei der Untersuchung von Proben mit einer Vielzahl von Objekten, von denen ein oder mehrere Objekte einzeln untersucht werden sollen, ergeben sich bei der Kombination des erfindungsgemäßen Verfahrens mit einem dielektrischen Zellsortierer, der zur Aufreihung und ggf. Sortierung der Objekte eingerichtet ist. Wenn vor dem Positionierungsschritt ein bestimmtes Objekt aus der Probe ausgewählt wird,

die einer dielektrischen Aufreihung unterzogen worden ist, kann die Selektivität der erfindungsgemäßen Deformationsuntersuchung erhöht werden.

5 Das erfindungsgemäße Verfahren kann allgemein mit jedem nachgiebigen, insbesondere elastisch oder plastisch deformierbaren Objekt durchgeführt werden, das kleiner als der jeweilige Untersuchungsbereich ist. Für die bevorzugte Anwendung in
10 fluidischen Mikrosystemen besitzen zu untersuchende Objekte typischerweise Größen im Bereich von 1 μm bis 50 μm . Das Objekt kann mit einer regelmäßigen oder unregelmäßigen Form und insbesondere kugelförmig gebildet sein. Das Objekt kann ein synthetisches Objekt aus einem deformierbaren, kompakten oder hohlen Material sein. Erfindungsgemäß können beispielsweise
15 Membran-Vesikeln, die mit einer Flüssigkeit gefüllt sind, untersucht werden, um die Struktur der Membranhülle zu untersuchen. Bevorzugte Anwendungen der Erfindung sind gegeben, wenn das zu untersuchende Objekt mindestens eine biologische Zelle, eine Zellgruppe, ein Zellbestandteil oder ein derartiges
20 Objekt im Verbund mit einem synthetischen Partikel umfasst. Das zu untersuchende Objekt kann auch porös sein und die Objekte selbst können Zellen, Zellenpaare, Zellaggregate/Zellgruppen oder Zellbestandteile sein. Weiterhin ist es möglich, dass auch synthetische Partikel, beispielsweise meh-
25 rere Beads, aggregieren.

Es ist auch möglich, durch eine Standardansteuerung eines dielektrophoretischen Feldkäfigs eine symmetrische Deformation von Objekten zu erreichen, die nicht klein sind im Ver-
30 hältnis zum Käfig (Größenverhältnis beispielsweise etwa 1/2) und relativ leicht deformierbar sind. Zellen, die in einem Käfig zentral gefangen werden und klein sind im Verhältnis zu den Elektrodenabmessungen des Käfigs (beispielsweise 1/8) können normalerweise nicht deformiert werden. Die Zelle er-

führt keine Dipolpolarisation im Fangpunkt. Um durch Multipole dennoch eine Deformation zu erzeugen, ist es bevorzugt, dass das Fangfeld nicht geschlossen ist, wie beispielsweise in den Abbildungen 3A und 3B gezeigt.

5

Die bevorzugte Anwendung der Erfindung in der Biotechnologie und Pharmazie beruht auf der Idee, einzelne Zellen in dielektrischen Feldkäfigen zu fangen und für kurze Zeit das Feld an den Elektroden derart zu verändern, dass hinreichend hohe Deformationskräfte erzeugt werden. Anschließend kann das elektrische Feld wieder in den Fangmodus versetzt und die Relaxation der Zelldeformation im Bereich niedriger Feldstärke beobachtet werden. Alternativ kann das Feld zwischen den Modi kurzzeitig auch ganz abgeschaltet werden. Dieser Prozess kann vorteilhafterweise an einer Zelle mehrfach wiederholt werden. Gemäß einer bevorzugten Variante der Erfindung wird in Abhängigkeit von den detektierten dielektrischen, geometrischen und/oder optischen Eigenschaften zwischen normalen und veränderten Zellen oder zwischen normalen Zellen mit verschiedenen physiologischen Eigenschaften, zum Beispiel während ihres Zellzyklus unterschieden. Des Weiteren kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zwischen normalen differenzierten Zellen und Stammzellen unterschieden werden. Das erfindungsgemäße Verfahren kann insbesondere zur Erkennung und Sortierung von Stammzellen aus einer Vielzahl von Zellen verwendet werden. Zusätzliche Informationen über die untersuchten Zellen können gewonnen werden, wenn die dielektrischen, geometrischen und/oder optischen Eigenschaften der Zelle in Abhängigkeit von der Frequenz und/oder Spannung des Positionierungs-Feldes und/oder des Deformations-Feldes detektiert werden. Des Weiteren können Abhängigkeiten von der Umgebungstemperatur, von der stofflichen Zusammensetzung, der Umgebungsflüssigkeit und/oder der Dauer einzelner Deformationen oder der Dauer von Mehrfachmessungen durchgeführt werden.

10
15
20
25
30

Wenn erfindungsgemäß eine Vermessung von Zellpaaren oder Zell-Aggregaten erfolgt, die ggf. erst im Positionierungsfeld zusammen geführt oder verbunden werden, ergeben sich
5 Vorteile im Vergleich zum Laser-Stretcher, mit dem nur einzelne Partikel deformiert werden können

Vorrichtungsbezogen wird die oben genannten Aufgabe der Erfindung mit einer Messapparatur zur Untersuchung von mindestens einem Objekt gelöst, die ein fluidisches Mikrosystem mit
10 einem Untersuchungsbereich mit mindestens einer Elektrodenanordnung, eine Detektoreinrichtung zur elektrischen und/oder optischen Messung von Objekteigenschaften, und eine Feldformungseinrichtung mit mindestens einem Hochfrequenzgenerator
15 und einer Schalteinrichtung enthält, mit der zwischen dem Fangmodus, in dem im Untersuchungsbereich mit der mindestens einen Elektrodenanordnung ein hochfrequentes Positionierungsfeld erzeugt wird, und dem Deformationsmodus umgeschaltet werden kann, in dem im Untersuchungsbereich mit der mindestens
20 einen Elektrodenanordnung ein Deformations-Feld erzeugt wird.

Wenn die Detektoreinrichtung ein Mikroskop mit einer Kamera aufweist, können sich Vorteile in Bezug auf die Genauigkeit
25 der Detektion an mikroskopisch kleinen Objekten, deren Durchmesser typischerweise geringer als 25 μm ist, ergeben.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Messapparatur mit einer Steuereinrichtung ausgestattet, die
30 mit der Detektoreinrichtung und der Schalteinrichtung verbunden ist. Diese Verbindung ermöglicht vorteilhafterweise die Realisierung eines Regelkreises, in dem Parameter der Positionierungs- und/oder Deformations-Felder und/oder der Suspen-

sionsflüssigkeit in Abhängigkeit vom Ergebnis einer Detektion eingestellt oder verändert werden können.

Das fluidische Mikrosystem der Messapparatur ist vorzugsweise mit einer Fluidikeinrichtung ausgestattet, mit der die Suspensions- und/oder eine zusätzliche Behandlungsflüssigkeit durch den Untersuchungsbereich bewegt werden kann und die ebenfalls mit der Steuereinrichtung verbunden ist.

Ein weiterer, unabhängiger Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines fluidischen Mikrosystems mit einem Hochfrequenz-Feldkäfig zur Untersuchung von Deformations- und/oder Relaxationseigenschaften biologischer Zellen und insbesondere zur Trennung oder Sortierung von gesunden Zellen und kranken Zellen, bspw. Krebszellen, oder die Sortierung von Stammzellen aus einer Zellprobe.

Die Erfindung besitzt die folgenden weiteren Vorteile. Es wird erstmalig ein Untersuchungsverfahren geschaffen, mit dem die Deformation und/oder Relaxation biologischer Zellen vollständig automatisierbar detektiert werden kann. Die Erfinder haben festgestellt, dass bei dielektrisch in Hochfrequenz-Feldkäfigen gehaltenen Zellen mit hochfrequenten elektrischen Feldern derart hohe Deformationskräfte ausgeübt werden können, dass die Deformation-Felder nur für kurze Zeiten und mit lokaler Begrenzung erzeugt werden müssen. Damit wird die Belastung der Zellen vermindert. Des Weiteren wird ein unerwünschtes Aufheizen der Elektrodenanordnung im Untersuchungsbereich vermieden oder deutlich reduziert.

30

Die Deformation von Partikeln, insbesondere von Zellen, kann dadurch unterstützt oder erreicht werden, dass Zellen mit Beads oder Metallkügelchen (Au) belegt werden. Diese Beads oder Metallkügelchen zeigen bei geeigneter Fangfrequenz eine

positive Dielektrophorese und können so die Partikel oder Zellen deformieren. Weiterhin ist es auch möglich, Zellen Beads oder Metallkügelchen phagozytieren zu lassen.

- 5 Eine weitere vorteilhafte Möglichkeit zum Deformieren von Zellen oder Partikeln ist, magnetische Beads zu verwenden, mit denen die Zellen belegt werden oder welche von den Zellen phagozytiert werden, um durch eine Anordnung schaltbarer magnetischer Elemente, beispielsweise außerhalb des Kanals
10 angeordnete Elektromagnete, eine Deformation der magnetischen Beads und damit der Zellen zu erreichen.

Eine weitere vorteilhafte Möglichkeit, eine Deformation einer Zelle oder eines Partikels zu erreichen, ist durch schnelles
15 An- und Ausschalten des Deformationsfeldes das Objekt bei einer Resonanzfrequenz zum Schwingen anzuregen. Dadurch wird eine wiederholte Deformation mit der Resonanzfrequenz erreicht, wobei ein Messen des Abklingens der Schwingung Rückschlüsse auf mechanische Eigenschaften der Zelle zulässt.

- 20 Das erfindungsgemäße Verfahren oder die erfindungsgemäße Vorrichtung kann auch vorteilhaft zur Pärchentrennung eingesetzt werden. Unter Pärchentrennung wird die Trennung zweier oder unter Umständen auch mehrerer aneinander
25 angelagerter Partikel verstanden. Wird ein solches Pärchen in einer erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung gefangen und anschließend durch Umschalten auf den Streckmodus getrennt, so kann in Abhängigkeit der durch die Dielektrophorese ausgeübten Kräfte eine Trennung der Objekte in verschiedene
30 Strömungspfade vorgenommen werden. Durch Variation der Frequenzen und/oder Deformationsspannung und/oder Deformationszeit wird zudem eine weitergehende Charakterisierung der Bindung zwischen Objekten ermöglicht.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung werden aus der Beschreibung der beigefügten Zeichnungen ersichtlich. Es zeigen:

- 5 Figur 1: eine schematische Darstellung einer
 Ausführungsform einer erfindungsgemäßen
 Messapparatur,
- 10 Figuren 2, 3: schematische, vergrößerte Illustrationen
 erfindungsgemäß verwendeter Elektroden-
 anordnungen,
- 15 Figur 4: ein Flussdiagramm zur Illustration einer
 Ausführungsform eines erfindungsgemäßen
 Verfahrens,
- 20 Figur 5: Mess- und Simulationsergebnisse zur Illus-
 tration der erfindungsgemäßen Deformation
 von Zellen,
- 25 Figur 6: eine schematische Illustration der Objekt-
 deformation in einem äußeren elektrischen
 Feld, und
- 30 Figur 7: schematische, vergrößerte Illustrationen
 erfindungsgemäß verwendeter
 Elektrodenanordnungen.

Die Erfindung wird im Folgenden beispielhaft unter Bezug auf
30 die Untersuchung biologischer Zellen in einem fluidischen
Mikrosystem beschrieben. Es wird betont, dass die Umsetzung
der Erfindung nicht auf die Untersuchung von biologischen
Zellen beschränkt, sondern entsprechend, insbesondere mit den
oben genannten Objekttypen möglich ist. Fluidische Mikro-

systeme mit Elektrodenanordnungen zur dielektrischen Manipulierung von suspendierten Partikeln sind an sich bekannt, so dass hier nur die zur Umsetzung des erfindungsgemäßen Verfahrens erforderlichen Einzelheiten erläutert werden.

5

Figur 1 zeigt eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Messapparatur mit dem fluidischen Mikrosystem 10, der Detektoreinrichtung 20 und der Feldformungseinrichtung 30. Das fluidische Mikrosystem 10 ist nur ausschnittsweise mit einer Elektrodenanordnung von Käfigelektroden 1-4 und optional vorgesehenen Deformations- oder Impedanzmess-
elektroden 5, 6 gezeigt. Die Elektroden 1-6 sind an sich bekannte Mikroelektroden, die an Boden-, Seiten- und/oder Deckwänden eines Kompartiments, z. B. eines Kanals 12 des
fluidischen Mikrosystems angeordnet sind. Der Kanal 12 wird in Pfeilrichtung A von einer Suspensionsflüssigkeit durchströmt. Zwischen den Elektrodenenden (Elektroden spitzen) der Elektrodenanordnung 1-6 ist der Untersuchungsbereich 11 gebildet, in dem die unten erläuterte Positionierung und
Deformation des zu untersuchenden Objekts O durchgeführt werden. Der Untersuchungsbereich 11 kann an einem Kreuzungspunkt des Kanals 12 mit einem weiteren Kanal (nicht dargestellt) des Mikrosystems gebildet sein, um das Objekt O im gehaltenen Zustand ggf. einer Behandlungsflüssigkeit
auszusetzen, die durch den weiteren Kanal zugeführt wird.

Die Detektoreinrichtung 20 umfasst ein Mikroskop 21, eine Kamera 22 und einen Bilddatenspeicher 23, die in bekannter Weise zusammenwirken. Das Mikroskop 21 ist beispielsweise ein IX70, Hersteller: Olympus mit einer CCD-Kamera 22 vom Typ Sensicam Vision, Hersteller: Photonics.

Die Feldformungseinrichtung 30 enthält einen Hochfrequenz-generator 31 und eine Schalteinrichtung 32. Beide Komponenten

können in einer gemeinsamen Schaltung integriert sein. Der Hochfrequenzgenerator ist eine Spannungsquelle zur Erzeugung hochfrequenter elektrischer Spannungen, typischerweise im Spannungsbereich von 0.1 bis 10Vrms und im Frequenzbereich von 1 kHz bis 100 MHz. Die Ausgangsspannungswerte, Phasen und Frequenzen der vom Hochfrequenzgenerator 31 generierten Spannungen sind vorzugsweise manuell oder mit der Steuereinrichtung 40 einstellbar.

- 10 Zur Manipulation, insbesondere Deformation, biologischer Zellen mittels negativer Dielektrophorese kann die Frequenz der Hochfrequenzspannung vorteilhafterweise in Abhängigkeit von der Außenleitfähigkeit so eingestellt werden, dass die Membran der untersuchten Zelle vollständig geladen wird.
- 15 Hierzu wird die Frequenz wesentlich geringer als der reziproke Wert der Membranrelaxationszeit τ_m gewählt ($f \ll f_m$). Die Membranrelaxationszeit hängt mit den Leitfähigkeiten gemäß Gleichung (2) zusammen:

$$20 \quad f_m = \frac{1}{2\pi\tau_m} \quad \tau_m = \varepsilon_0 \varepsilon_m \frac{R}{h} \left(\frac{1}{\sigma_c} + \frac{1}{2\sigma_e} \right) \quad (2)$$

In diesem Fall kann die Zelle gemäß Gleichung (3) lediglich elongiert werden.

$$25 \quad P_D = \frac{9}{2} \varepsilon_0 \varepsilon_m E^2 \cos^2[\Theta] \frac{R}{h} \quad (3)$$

- Bei hohen Frequenzen $f \gg f_m$ ist die Zellmembran kapazitiv überbrückt, so dass die Zelle in Abhängigkeit von den Außen- und Innenleitfähigkeiten entweder elongiert oder komprimiert wird (siehe Gleichung (1), oben).

Der Hochfrequenzgenerator 31 ist zur Erzeugung von Spannungs-
verläufen entsprechend verschiedener Betriebsmodi der Mess-
apparatur eingerichtet, die unten beispielhaft illustriert
sind. Ein erster Betriebsmodus ist der Halte- oder Fangmodus,
5 in dem das Objekt O (z. B. die biologische Zelle) im
Potentialminimum des von den Käfig-Elektroden 1-4 erzeugten
dielektrischen Feldkäfigs gehalten wird. Die Zelle O
befindet sich trotz strömender Suspensionsflüssigkeit (Pfeil
A) im ruhenden Zustand. Die Ansteuerprotokolle der Käfig-
10 Elektroden (Spannungen, Frequenzen, Phasen) sind aus der
fluidischen Mikrosystemtechnik an sich bekannt. Im zweiten
Betriebsmodus, nämlich dem Deformations-Modus werden
derartige Spannungen erzeugt, dass auf die gehaltene Zelle O
gerichtete Deformationskräfte ausgeübt werden (siehe unten),
15 wobei in diesem Zustand die Flüssigkeitsströmung gestoppt
ist.

Mit der schematisch gezeigten Schalteinrichtung 32 wird der
aktuell gewünschte Betriebsmodus ausgewählt, in dem die
20 jeweiligen Elektroden mit der gewünschten Spannung beauf-
schlagt werden. Die Schalteinrichtung 32 kann einen Umschal-
ter oder einen Phasenschieber umfassen und/oder in die
Steuerung des Hochfrequenzgenerators 31 integriert sein. Bei
beiden Varianten kann eine Betätigung mit der Steuerein-
25 richtung 40 vorgesehen sein.

Das Bezugszeichen 50 verweist auf eine Fluidikeinrichtung,
mit der die Suspensions- und/oder Behandlungsflüssigkeit im
Kanal 12 des fluidischen Mikrosystems 10 bewegt wird. Die
30 Fluidikeinrichtung 50 umfasst beispielsweise eine Pumpe, die
ggf. mit der Steuereinrichtung 40 betätigbar ist.

Figur 2 zeigt die Käfigelektroden 1-4, 1'-4' in vergrößerter
Perspektivansicht. Die unteren vier Elektroden 1'-4' sind auf

dem Boden 13 des fluidischen Mikrosystems 10 angeordnet, während die Elektroden 1-4 an der Deckfläche (nicht dargestellt) angeordnet sind. Die Kanalrichtung entspricht der Strömungsrichtung A der Suspensionsflüssigkeit. Bei Beaufschlagung der Käfigelektroden mit hochfrequenten elektrischen Spannungen entsprechend einer der in der folgenden Tabelle angegebenen Ansteuerarten „trap rot“, „trap ac I“ oder „trap ac II“ wird ein dielektrischer Feldkäfig mit einem punktförmigen Potentialminimum in der Mitte zwischen den Enden der Elektroden gebildet, an dem die zu untersuchende Zelle lokalisiert wird.

Elektrode/ Modus	1	2	3	4	1'	2'	3'	4'
trap rot	0°	90°	180°	270°	180°	270°	90°	180°
trap ac I	0°	180°	0°	180°	180°	0°	180°	0°
trap ac II	0°	180°	0°	180°	0°	180°	0°	180°
stretch ac I	0°	0°	180°	180°	0°	0°	180°	180°
stretch ac II	0°	0°	0°	0°	180°	180°	180°	180°
stretch ac III	0°	Masse	180°	Masse	0°	Masse	180°	Masse
trap-stretch	$F_1/0^\circ$	$F_2/0^\circ$	$F_1/180^\circ$	$F_2/180^\circ$	$F_1/0^\circ$	$F_2/180^\circ$	$F_1/180^\circ$	$F_2/0^\circ$

Die Ansteuerart „trap rot“ dient dem Einfangen der Zellen im Feldkäfig und einer Drehung der Zelle in eine vorbestimmte Ausrichtung relativ zum umgebenden Mikrosystem. Vorteilhafterweise können in diesem Fall Deformationen in bestimmten Richtungen untersucht werden. Die Ansteuerarten „trap ac I“, und „trap ac II“ dienen dem Einfangen der Zelle im Feldkäfig ohne eine bestimmte Orientierung. Durch Umschalten der relativen Phasenlage zwischen den hochfrequenten Spannungen an den Käfig-Elektroden entsprechend den Ansteuerarten „stretch ac I“ oder „stretch ac II“ wird vom Fangmodus zum Deformationsmodus gewechselt. Durch die Polarisierung der zu untersuchenden Zellen werden bei den beispielhaft angegebenen Ansteuerarten Deformationskräfte parallel zu Strömungsrichtung

A gebildet, so dass sich die Zelle deformiert (siehe Figur 5). Ein weiterer Streckmodus „stretch ac III“ erzeugt ein Deformationsfeld in einem Oktodenkäfig mit zwei gegenüberliegenden Elektrodenpaaren, wobei sich die anderen Elektroden auf Masse befinden. Außerdem ist ein „trap-stretch“-Modus angegeben, der demonstriert, wie gleichzeitig über verschiedene Elektroden ein Partikel bei einer Frequenz F1 deformiert werden kann und mit einer anderen Frequenz F2 in der vom Deformationsfeld geschwächten Richtung dielektrisch fokussiert werden kann. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung dieser Art der Ansteuerung im Zusammenhang mit einem Elektrodenfeldkäfig mit zwölf oder mehr Elektroden, wie beispielsweise in Figur 7C gezeigt. Dabei kann beispielsweise die Deformation mit den schmalen, zentralen beiden Elektrodenpaaren bei gleichzeitiger dielektrischer Fokussierung des Partikels durch die äußeren Elektroden des verbleibenden Oktodenkäfigs erfolgen.

Figur 3A zeigt Käfig-Elektroden 1, 2, 1' und 2', die zur Bildung eines in Strömungsrichtung A offenen dielektrischen Feldkäfigs eingerichtet sind. In der folgenden Tabelle sind entsprechend die Ansteuerarten für den Fangmodus „trap ac“, in dem die Zellen in der Kanalmitte fokussiert werden, und dem Deformationsmodus „stretch ac I“ oder „stretch ac II“ zusammengestellt.

Elektrode/	1	2	1'	2'
Modus				
trap ac	0°	180°	180°	0°
stretch ac I	180°	0°	180°	0°
stretch ac II	180°	180°	0°	0°

In den Figuren 3B und 3C sind die elektrischen Potentiale für den „trap ac“-Modus (Figur 3B) und für den „stretch ac I“-

Modus (Figur 3C) für die Käfigelektroden-Anordnung der Figur 3A dargestellt. Die Figuren 3B und 3C sind eine Schnittansicht des Kanals mit den geschnitten dargestellten Elektroden, wobei die Fließrichtung des Kanals senkrecht zur Bildebene ist. In Figur 3B ist für den „trap ac I“-Modus die zentriert gehaltene Zelle mit Polarisationsladungen gezeichnet. Deutlich ist zu sehen, dass Zellen bei dieser Elektrodenanordnung auch ohne Streckfelder leichter als im Acht-Elektroden-Käfig deformiert werden können, da auf die Zelle in der auf der Ebene senkrecht stehenden Richtung, also in Strömungsrichtung, keine Kräfte wirken. Vorteilhafterweise kann eine weitere Homogenisierung des Streckfeldes (Figur 3C) mittels Zusatzelektroden, die in der Ebene zwischen den vorhandenen Elektroden angeordnet werden, erreicht werden.

In Figur 4 ist die Schrittfolge zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens schematisch illustriert. Nach einer Aufreihung (Schritt 100), bei der eine Probe aus einer Vielzahl von Zellen in an sich bekannter Weise stromaufwärts vom Untersuchungsbereich 11 dielektrisch aufgereiht wird, erfolgt bei Schritt 200 die Positionierung eines Partikels im dielektrischen Feldkäfig der Käfigelektroden beispielsweise gemäß Figur 2. Anschließend folgt durch Änderung der Elektrodenansteuerung die Zelldeformation (Schritt 300), wobei während der Ausübung der Deformationskräfte und/oder nach Abschalten der Deformationskräfte die Deformation (Schritt 400) oder die Relaxation (Schritt 500) elektrisch oder optisch erfasst wird. Anschließend oder zeitgleich (online) folgt bei Schritt 600 die Auswertung und quantitative Analyse der Deformation. In Abhängigkeit vom Ergebnis von Schritt 600 kann vorgesehen sein, dass eine weitere Deformation mit zugehöriger Detektion durchgeführt wird. Vor der weiteren Deformation kann ggf. eine Drehung des Objekts bei Schritt 200 vorgesehen sein. Schließlich folgt bei Schritt 700 die Entscheidung, ob

ein weiteres Objekt untersucht oder die Messung beendet werden soll. Gegebenenfalls ist bei Schritt 800 die Ablage des Objekts in einem passenden Behälter oder auf einem Substrat, z. B. in einer Mikrotiterplatte vorgesehen.

5

Figur 5 zeigt beispielhaft die Deformation eines Erythrozyten in einem Feldkäfig durch Umschalten vom Fang- in den Deformationsmodus. Der Untersuchungsbereich besitzt einen Durchmesser von rd. 40 μm . Die Frequenz der Positionierungs- und Deformationsfelder beträgt 700 kHz ($3V_{\text{rms}}$). Die Leitfähigkeit der Suspensionsflüssigkeit beträgt 0.3 S/m. Die Figuren 5A und B zeigen mikroskopische Abbildungen des Erythrozyten O im Fang- und Deformationsmodus. Die Figuren 5C bis D illustrieren die Feldverteilung in der horizontalen Zentralebene der Elektrodenanordnung gemäß Figur 2 im Fangmodus für die Ansteuerprotokolle „trap rot“ oder „trap ac II“. Es sind jeweils als Äquipotentiallinien die Verläufe der zeitlich gemittelten Werte des Quadrates des elektrischen Feldes (E^2) in der zentralen horizontalen Ebene zwischen den Elektroden zu einem bestimmten Zeitpunkt dargestellt. Die auf das Objekt wirkenden Polarisationskräfte sind proportional zur Größe E^2 . Die Figur 5E zeigt den Verlauf von E^2 im Streckmodus. Die Figur 5F zeigt das elektrische Potential ϕ im Streckmodus bei Realisierung der Ansteuerart „stretch ac I“.

25

Wie aus den Feldsimulationen hervorgeht, befindet sich eine Zelle, die zunächst zentral im Käfig gefangen war (Figur 5A, Nullfeld) bei Umschalten auf den Streckmodus in einem starken relativ homogenen (sattelförmigen) elektrischen Feld. Ohne äußere Störungen verbleibt die Zelle im Zentralbereich, wo sie deformiert wird (Figur 5B). Experimentell verbleibt die Zelle bei gut äquilibrierter Fluidik bis zu einigen Sekunden im Zentralbereich, wo nach Um- bzw. Abschalten die Relaxation beobachtet werden kann.

30

Diese Untersuchungen können im Fluss (siehe Figur 3) und ggf. an mehreren z. B. über mit trichterförmigen Felddbarrieren (durch „Trichter-Elektroden“ oder sog. Funnel) aufgereihten
5 Zellen parallel ausgeführt werden.

Bei der Messung der Deformation und/oder Relaxation (Schritte 400, 500) werden bspw. Bilder des Objekts O, die mit der Detektoreinrichtung 20 aufgenommen wurden, vermessen. Es wird
10 bspw. der Objektdurchmesser vor und während der Deformation erfasst. Zur Ermittlung von Relaxationszeiten wird eine entsprechende Zeitabhängigkeit aufgenommen. Wenn bspw. eine kugelförmige Zelle zu einem Ellipsoid deformiert wird, erfolgt eine Messung der Halbachsen des Ellipsoids. Aus den geome-
15 trischen Messwerten und/oder der ermittelten Zeitfunktion werden in Abhängigkeit vom angewendeten Modell die gewünschten elastischen Eigenschaften ermittelt.

Abweichend von der oben beispielhaft beschriebenen Verfahrensweise können bei der Realisierung der Erfindung die folgenden Modifizierungen vorgesehen sein.
20

Es kann eine Parameteroptimierung vorgesehen sein, bspw. um das Objekt O möglichst gut im Zentrum des Untersuchungsbereiches zu halten. Hierzu werden aus den Bilddaten der Detektoreinrichtung Steuersignale abgeleitet, mit denen die
25 Parameter der Ausgangsspannungen des Hochfrequenzgenerators eingestellt werden, bis die gewünschte Zentrierung gegeben ist. Ein entsprechender Regelkreis kann auf die Veränderung der Feldstärke oder Frequenz der Deformations-Felder gerichtet sein, um ein bestimmtes Deformationsergebnis zu erzielen.
30 Es können feldstärke- und/oder frequenzabhängige Deformationsmessungen durchgeführt werden.

Alternativ oder zusätzlich zum oben beschriebenen Streckmodus in horizontaler Ebene kann eine Deformation in einer anderen Richtung, z. B. in vertikaler Ebene durchgeführt werden. Des Weiteren kann eine gerichtete Streckung des Objekts O im
5 Feldekäfig zu einer Nadelform vorgesehen sein.

Zur Optimierung der Positionierungs- oder Deformations-Felder können sich deren Frequenzen unterscheiden. Die Deformations-Felder können gleichzeitig zu einem permanent gebildeten
10 Positionierungs-Feld erzeugt werden. Gemäß Gleichung (1) können elongierende oder komprimierende Felder gebildet werden.

Generell ist es möglich, sowohl das Fang- als auch das
15 Streckfeld gleichzeitig und nicht alternierend einzukoppeln (beispielsweise "trap-stretch"-Modus). Dies kann beispielsweise vorteilhafterweise dadurch geschehen, dass das Fangfeld und das Streckfeld mit unterschiedlichen Frequenzen arbeiten.

20 Anstelle der Acht- oder Vier-Elektrodenfeldekäfige können andere Elektrodengeometrien realisiert werden, wie sie an sich aus der fluidischen Mikrosystemtechnik bekannt sind. Es können bspw. Sechs-Pol-Elektrodenanordnungen realisiert werden.

25 Es kann darüber hinaus von Vorteil sein, Mehrelektrodenanordnungen, insbesondere Elektrodenanordnungen mit zwölf Elektroden, zur Erzeugung homogener Streckfelder bei praktisch unverändertem Fangfeld zu verwenden. Fig 7 zeigt das Quadrat der gemittelten Feldstärke E^2 in der horizontalen Ebene
30 zwischen den Elektroden. In den Figuren 7A und 7B sind Elektrodenanordnungen gezeigt, die den oben in Zusammenhang mit den Figuren 5A bis 5F beschriebenen entsprechen. Mit dem Pfeil wird die Fließrichtung des Kanals gekennzeichnet. In

den Figuren 7C und 7D sind Elektrodenanordnungen mit insgesamt zwölf Elektroden gezeigt, von denen nur die oberen sechs Elektroden dargestellt sind. Vorzugsweise werden die zusätzlichen Elektroden mittig auf einer Ebene zwischen den
5 acht Elektroden angebracht, wobei die zusätzlichen Elektroden den Kanal senkrecht zur Strömungsrichtung schneiden. Durch die Zusatzelektroden wird im Streckmodus das Feld in der Nähe des Fangpunktes homogener, so dass ein dort angeordnetes Partikel geringere dielektrophoretische Kräfte erfährt (siehe
10 Figuren 7C und 7D). Gerade dann, wenn sich die Strömung in Kanalrichtung nicht vollständig beruhigt hat, können die mittleren zusätzlichen Elektroden besonders vorteilhaft sein, da sie in Strömungsrichtung fokussieren. Die Ansteuerung ist im „stretch ac I“-Modus besonders einfach realisieren, da
15 keine zusätzlichen Phasen benötigt werden. Die zusätzlichen Elektroden werden entsprechend der jeweils beiden benachbarten Elektroden entweder auf 0° oder 180° geschaltet.

Sowohl im Fall der acht Elektroden als auch im Fall der zwölf
20 Elektroden ergibt sich im „stretch ac I“-Modus ein Sattel in der Mitte des Fangfeldes (siehe Fig. 7B und 7D). Um dies zu vermeiden, kann es vorteilhaft sein, wenn die äußeren Grenzen der Elektrodenspitzen der schräg angeordneten Elektroden parallel zueinander verlaufen, wie dies in den Figuren 7E und
25 7F dargestellt ist. In den Figuren 7E und 7F sind die parallel verlaufenden äußeren Grenzen der Elektrodenspitzen im Zusammenhang mit einer Zwölf-Elektrodenanordnung gezeigt. Die parallel verlaufenden äußeren Grenzen der Elektrodenspitzen können jedoch auch im Fall einer Acht-Elektrodenanordnung, wie sie in den Figuren 7A und 7B gezeigt ist, vor-
30 teilhaft angewendet werden. Allgemein sind parallel verlaufende äußere Grenzen der Elektrodenspitzen dazu geeignet, homogenere Streckfelder zu erzeugen. Das verbesserte homogene Streckfeld im Falle der parallel verlaufenden äußeren Grenzen

der Elektroden spitzen ist in der Figur 7F für den „stretch ac I“-Modus dargestellt. Eine andere Möglichkeit, eine höhere Homogenität zu erreichen, ist, dass die Elektroden nicht äquidistant angeordnet werden (nicht dargestellt).

5

Die in der bevorstehenden Beschreibung, den Zeichnungen und den Ansprüchen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausgestaltungen von

10 Bedeutung sein.

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Untersuchung von mindestens einem deformierbaren Objekt (O) in einer Suspensionsflüssigkeit, mit den Schritten:
- Erzeugung eines elektrischen Positionierungs-Feldes und Positionierung des Objekts (O) in einem Potentialminimum des
 - 10 Positionierungs-Feldes,
 - Erzeugung eines elektrischen Deformations-Feldes derart, dass eine Deformationskraft auf das Objekt (O) ausgeübt wird, und
 - Detektion von mindestens einer Eigenschaft aus der Gruppe
 - 15 der dielektrischen, geometrischen und optischen Eigenschaften des Objekts (O),
- dadurch gekennzeichnet, dass**
- das Positionierungs-Feld in einem Kompartiment (12) eines fluidischen Mikrosystems (10) erzeugt wird, und
 - 20 - die Positionierung des Objekts (O) ohne Elektrodenkontakt oder in frei suspendiertem Zustand berührungslos erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Positionierung des Objekts (O) unter der Wirkung negativer Dielektrophorese oder
- 25 unter der Wirkung positiver Dielektrophorese erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Erzeugung der Deformationskraft unter Wirkung negativer Dielektrophorese oder unter der Wirkung positiver Dielektrophorese erfolgt.
- 30
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, bei dem die Detektion während oder nach der Deformation des Objekts (O) erfolgt und

entsprechend eine Erfassung von Deformations- oder Relaxationseigenschaften des Objekts (O) umfasst.

5 5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem das Positionierungs-Feld als ein Hochfrequenz-Feldkäfig mit einer Käfig-Elektrodenanordnung (1-4, 1'-4') erzeugt wird.

10 6. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem der Hochfrequenz-Feldkäfig als geschlossener Feldkäfig mit einem punktförmigen Potentialminimum betrieben wird, in dem das Objekt (O) ruht.

15 7. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem der Hochfrequenz-Feldkäfig als offener Feldkäfig mit einem linienförmigen Potentialminimum betrieben wird, durch das sich das Objekt (O) mit der Suspensionsflüssigkeit bewegt.

20 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, bei dem die Käfig-Elektrodenanordnung (1-4, 1'-4') zur Erzeugung des Deformations-Feldes verwendet wird.

25 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, bei dem eine separate Deformations-Elektrodenanordnung (5, 6) zur Erzeugung des Deformations-Feldes verwendet wird.

10. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Deformations-Feld für eine Dauer von 1 ms bis 500 ms eingestellt wird.

30 11. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Erzeugung des Deformations-Feldes impulsförmig erfolgt.

12. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Objekt (O) vor oder während der Erzeugung des Deformations-Feldes einer Behandlungsflüssigkeit ausgesetzt wird.

5

13. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, mit einer Mehrfachmessung, bei der die Schritte Erzeugung des Deformations-Feldes mit der Detektion und die Erzeugung des Positionierungs-Feldes abwechselnd mehrfach aufeinander folgend durchgeführt werden.

10

14. Verfahren nach Anspruch 13, bei dem die Mehrfachmessung für die Dauer von mindestens einer Sekunde durchgeführt wird.

15

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, bei dem das Positionierungs-Feld und/oder das Deformations-Feld in Abhängigkeit vom Ergebnis der jeweils vorhergehenden Detektion eingestellt oder verändert wird.

20

16. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 15, bei dem das Deformations-Feld und/oder das Positionierungs-Feld mehrfach so eingestellt wird, dass das Objekt (O) jeweils in verschiedenen Richtungen deformiert wird.

25

17. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem aus den detektierten dielektrischen, geometrischen und/oder optischen Eigenschaften viskoelastische Eigenschaften des Objekts (O) ermittelt werden.

30

18. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem vor dem Positionierungs-Schritt das Objekt (O) aus einer Probe ausgewählt wird, die einer dielektrischen Aufreihung unterzogen worden ist.

19. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Objekt (O) mindestens eine biologische Zelle, eine Zellgruppe, ein Zellbestandteil oder ein synthetisches Partikel umfasst.

5

20. Verfahren nach Anspruch 19, bei dem in Abhängigkeit von den detektierten dielektrischen, geometrischen und/oder optischen Eigenschaften zwischen normalen und veränderten Zellen oder zwischen normalen Zellen mit verschiedenen physiologischen Eigenschaften unterschieden wird.

10

21. Verfahren nach Anspruch 19, bei dem in Abhängigkeit von den detektierten dielektrischen, geometrischen und/oder optischen Eigenschaften Stammzellen erkannt werden.

15

22. Verfahren nach Anspruch 19, 20 oder 21, bei dem die dielektrischen, geometrischen und/oder optischen Eigenschaften der Zelle in Abhängigkeit von mindestens einem der folgenden Parameter detektiert werden:

20

- Frequenz des Positionierungs-Feldes
- Frequenz des Deformations-Feldes,
- Spannung des Positionierungs-Feldes
- Spannung des Deformations-Feldes,
- Temperatur der Suspensions- oder Behandlungsflüssigkeiten,
- 25 - stoffliche Zusammensetzung der Suspensions- oder Behandlungsflüssigkeiten,
- Dauer der einzelnen Deformation, und
- Dauer von mehreren Deformationen.

25

30

23. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 22, bei dem eine Vermessung von Zellpaaren oder Zell-Aggregaten und/oder eine Trennung von Zellpaaren erfolgt.

24. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem die Zellpaare oder Zell-Aggregate im Positionierungs-Feld zusammen gebracht werden.

5 25. Messapparatur zur Untersuchung von mindestens einem Objekt, die umfasst:

- ein fluidisches Mikrosystem (10), das ein Kompartiment (12) mit mindestens einer Elektrodenanordnung (1-4, 1'-4') aufweist,

10 - eine Detektoreinrichtung (20), die zur elektrischen, geometrischen und/oder optischen Messung von Objekteigenschaften eingerichtet ist, und

- eine Feldformungseinrichtung (30) mit mindestens einem Hochfrequenzgenerator (31),

15 **dadurch gekennzeichnet**, dass

- die Feldformungseinrichtung (30) zwischen einem Betriebszustand, in dem im Kompartiment (12) mit der mindestens einen Elektrodenanordnung (1-4, 1'-4') ein hochfrequentes Positionierungs-Feld erzeugt wird, und einem Betriebszustand umgeschaltet werden kann, in dem im Untersuchungsbereich (11) mit der mindestens einen Elektrodenanordnung ein Deformations-Feld erzeugt wird.

25 26. Messapparatur nach Anspruch 25, bei der die Feldformungseinrichtung (30) eine Schalteinrichtung (32) enthält, mit der zwischen den Betriebszuständen umgeschaltet werden kann.

30 27. Messapparatur nach Anspruch 25 oder 26, bei der die Detektoreinrichtung (20) ein Mikroskop (21) mit einer Kamera (22) aufweist.

28. Messapparatur nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche 25 bis 27, bei der das fluidische Mikrosystem (10) mit einer Fluidikeinrichtung (40) zur Bewegung einer Suspen-

sions- und/oder einer Behandlungsflüssigkeit durch den Untersuchungsbereich (11) ausgestattet ist.

29. Messapparatur nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche 25 bis 28, bei der eine Steuereinrichtung (50) vorgesehen ist, die mit der Detektoreinrichtung (20) und der Schalteinrichtung (32) verbunden ist.

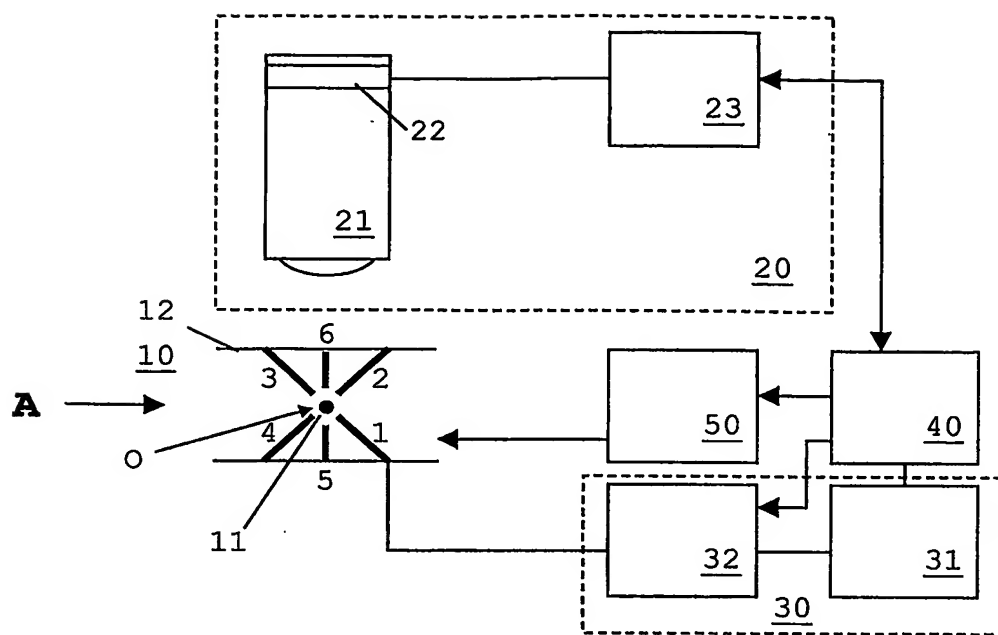
30. Messapparatur nach Anspruch 29, bei der mit der Steuereinrichtung (50) ein Regelkreis gebildet wird, in dem das Positionierungs-Feld und/oder das Deformations-Feld in Abhängigkeit vom Ergebnis der vorhergehenden Detektion eingestellt oder verändert werden kann.

31. Messapparatur nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche 25 bis 30, bei der die Elektrodenanordnung Elektroden mit Elektrodenspitzen umfasst, wobei die Elektrodenspitzen benachbarter Elektroden zumindest abschnittsweise parallel verlaufende Ränder aufweisen.

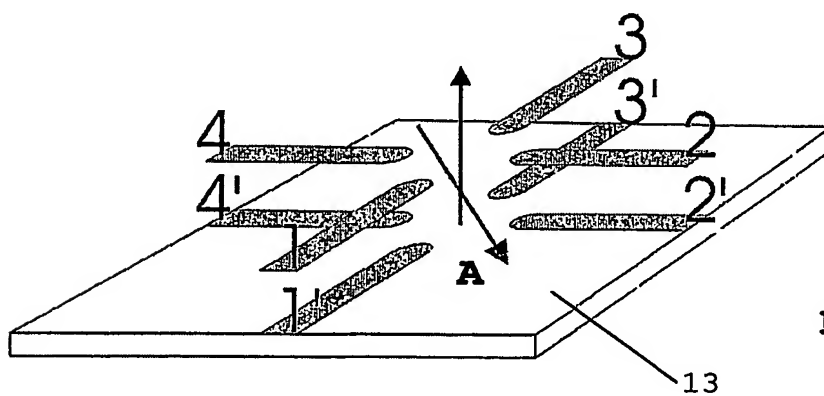
32. Messapparatur nach Anspruch 31, bei der die parallel verlaufenden Ränder parallel oder senkrecht zu einer Längsrichtung des Kompartiments des fluidischen Mikrosystems ausgerichtet sind.

33. Messapparatur nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche 25 bis 32, bei der im zweiten Betriebszustand das Positionierungsfeld und das Deformationsfeld gleichzeitig eingeschaltet sind.

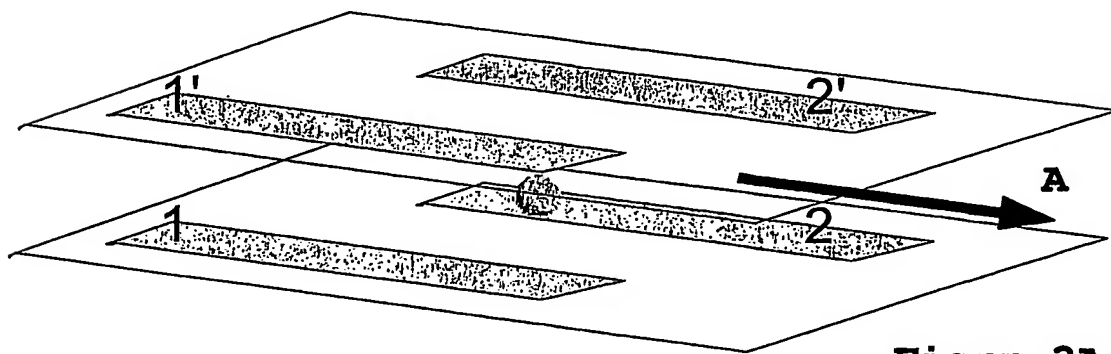
34. Verwendung eines fluidischen Mikrosystems mit einem Hochfrequenz-Feldkäfig zur Untersuchung von Deformations- und/oder Relaxationseigenschaften biologischer Zellen.



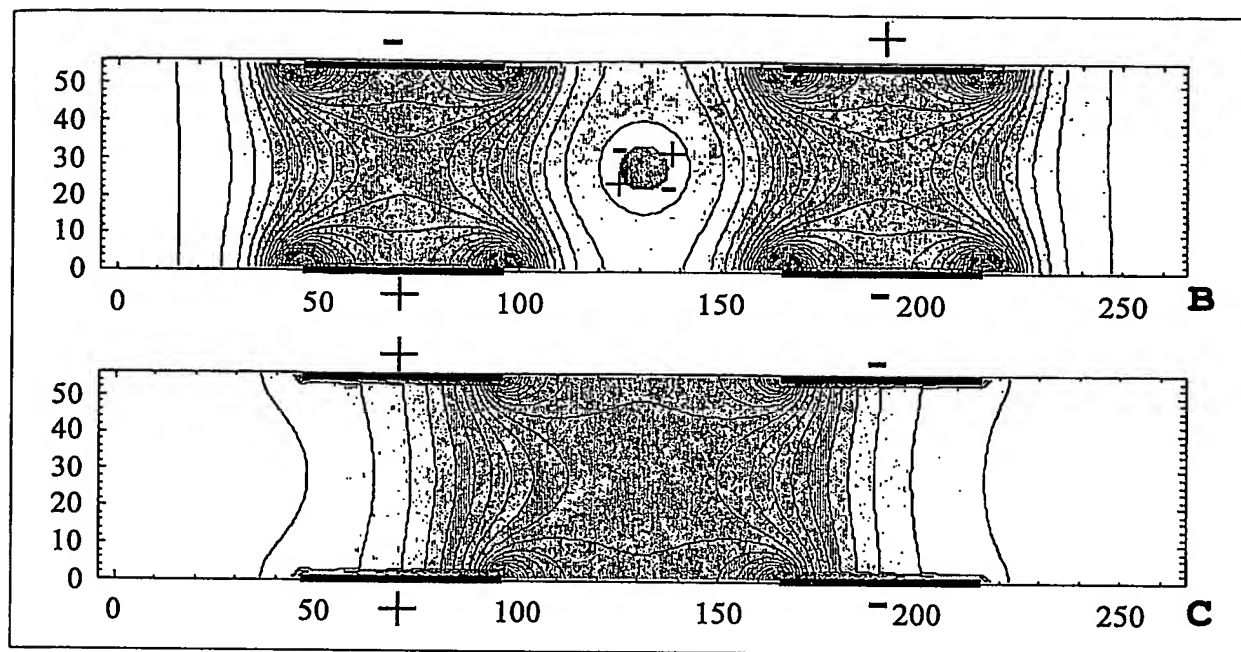
Figur 1

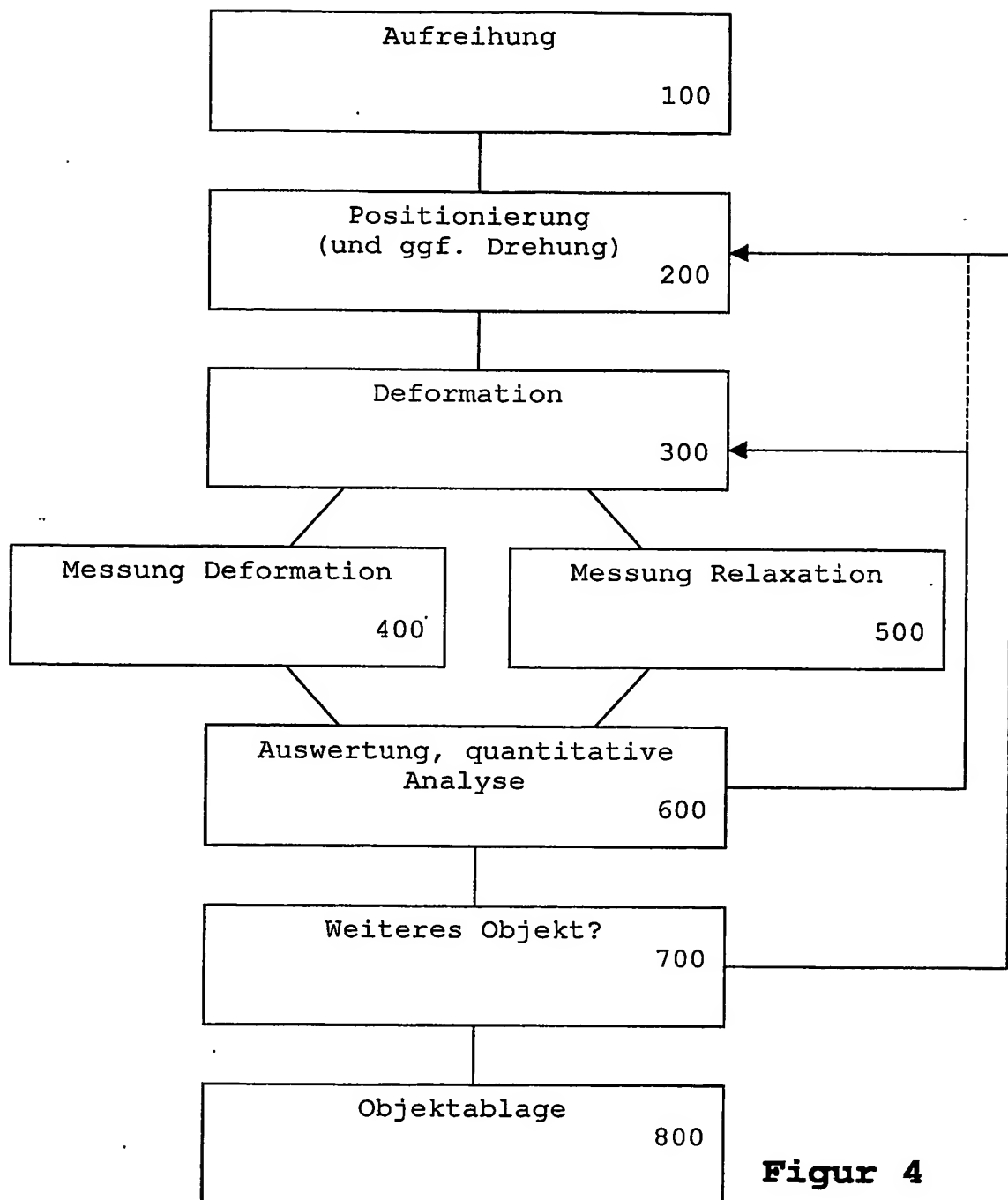


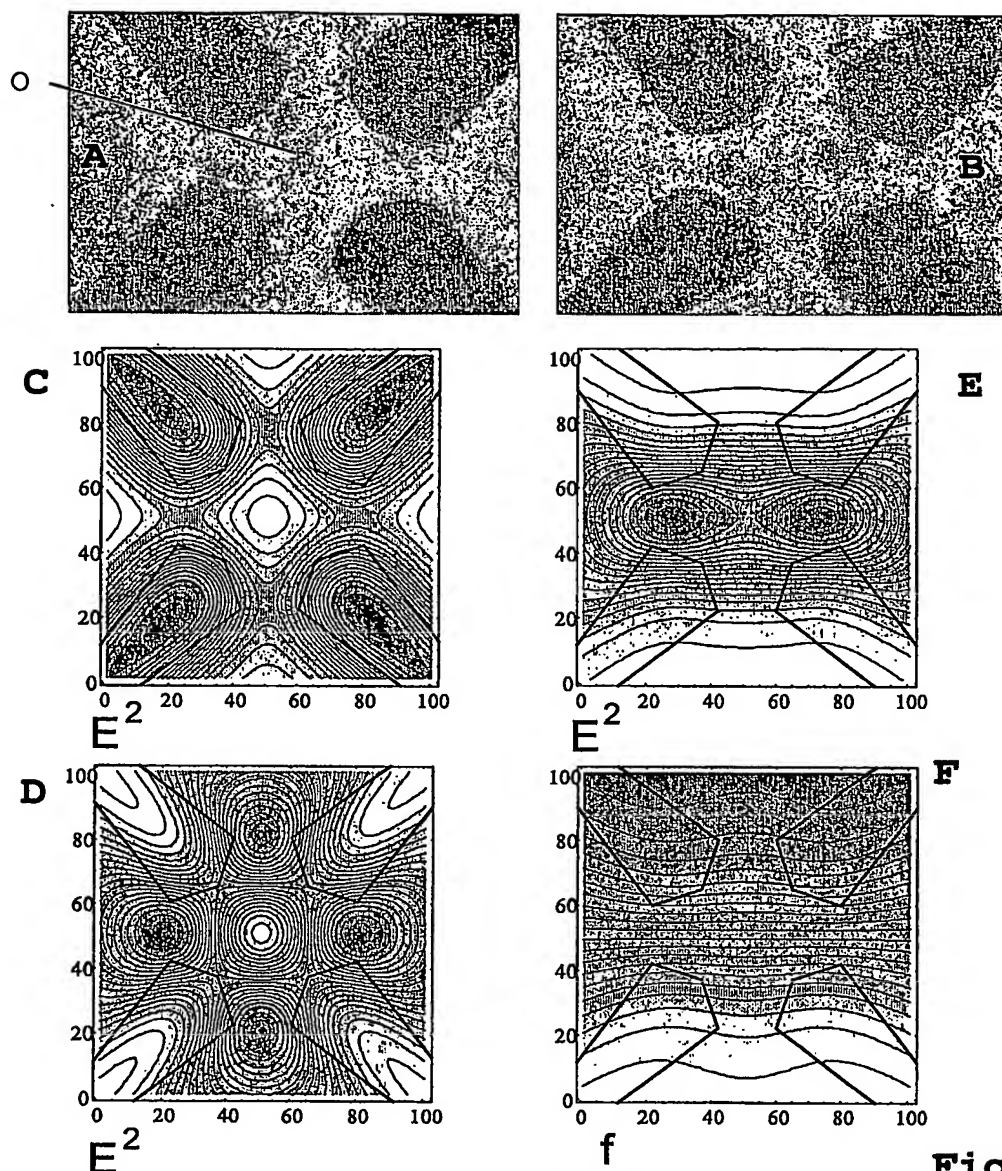
Figur 2



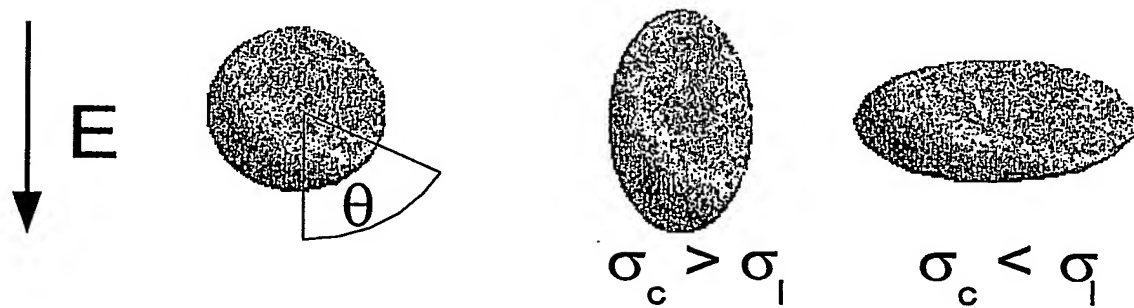
Figur 3A

**Figur 3B, 3C**

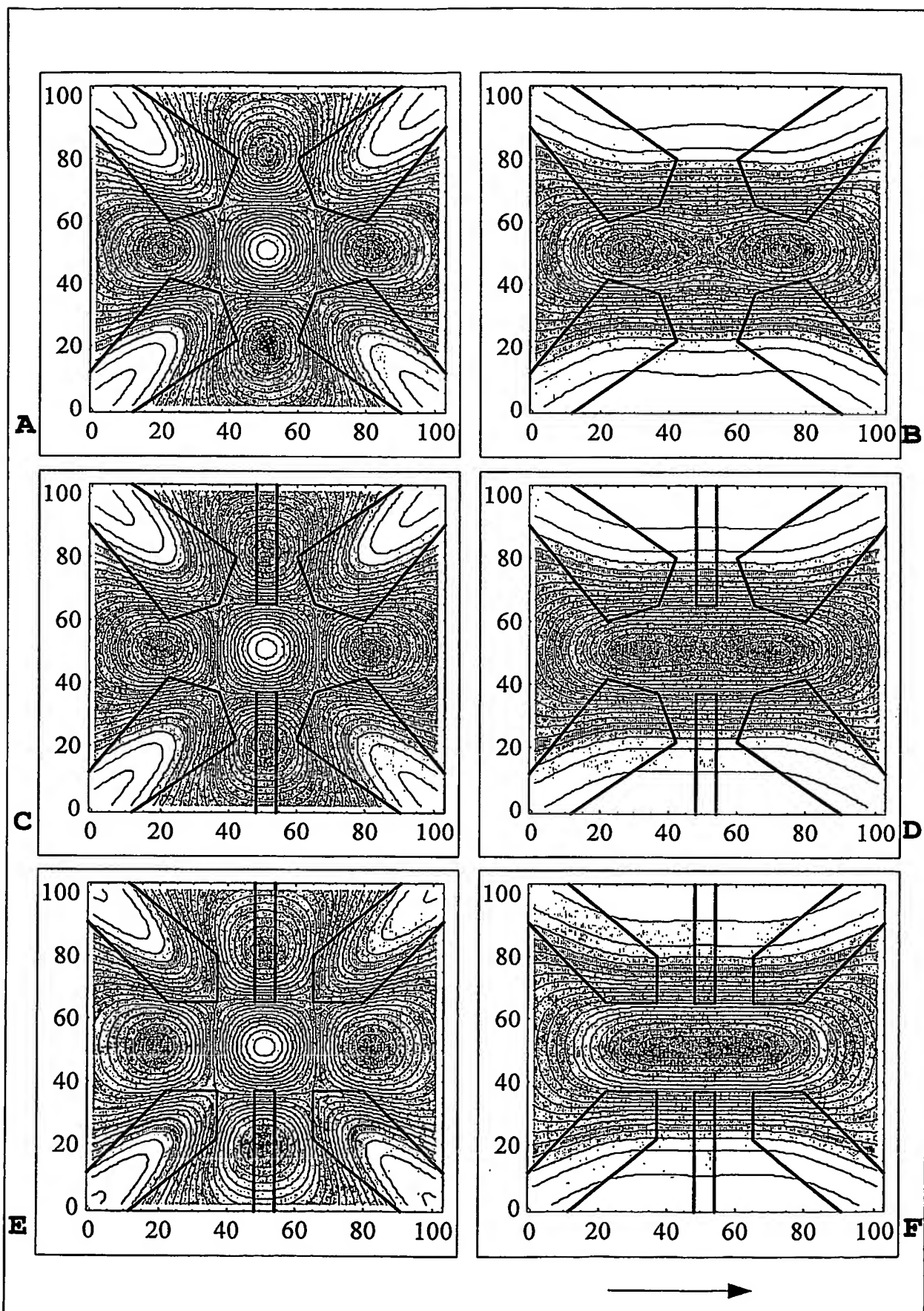
**Figur 4**



Figur 5



Figur 6



Figur 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/012741

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N15/14 G01L1/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N G01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, INSPEC, WPI Data, PAJ, BIOSIS, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 6 067 859 A (KAES ET AL) 30 May 2000 (2000-05-30) cited in the application ----- -/-	1,4,12, 17, 19-22, 24,34 25,27,28

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 February 2005

Date of mailing of the international search report

01/03/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Koch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/012741

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SCHNELLE TH ET AL: "Trapping in AC octode field cages" JOURNAL OF ELECTROSTATICS, vol. 50, 8 October 1999 (1999-10-08), pages 17-29, XP002317314 Retrieved from the Internet: URL: http://springerlink.metapress.com/media/C2GVULMXXJEEFB7HWKAK/Contributions/6/Q/L/1/6QL1QR0BJ99RPEG7.pdf 'retrieved on 2005-02-10! cited in the application abstract page 17, paragraph 1 - page 19, paragraph 1 page 20, line 13 - page 21, paragraph 1 page 21, paragraph 3 - page 25, paragraph 2 figures 1-5</p>	<p>1-3,5-7, 22,25, 27-29</p>
A	<p>MÜLLER K ET AL: "Reversible Electroporabilization of Mammalian Cells by High-Intensity, Ultra-Short Pulses of Submicrosecond Duration" JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY, vol. 184, 15 May 2001 (2001-05-15), - 20 July 2001 (2001-07-20) pages 161-170, XP002317315 cited in the application abstract</p>	<p>1,25,34</p>
A	<p>ENGELHARDT H ET AL: "Viscoelastic properties of erythrocyte membranes in high-frequency electric fields" NATURE UK, vol. 307, no. 5949, 26 January 1984 (1984-01-26), - 1 February 1984 (1984-02-01) pages 378-380, XP002317316 ISSN: 0028-0836 cited in the application abstract</p>	<p>1-34</p>
A	<p>US 4 525 666 A (GROVES ET AL) 25 June 1985 (1985-06-25) column 1, line 5 - column 1, line 10 column 3, line 3 - column 3, line 61 column 4, line 41 - column 4, line 63 column 8, line 50 - column 10, line 3 figure 3</p>	<p>1,25,34</p>

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/012741

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p> DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 15 November 2001 (2001-11-15), MUELLER K J ET AL: "Reversible electroporabilization of mammalian cells by high-intensity, ultra-short pulses of submicrosecond duration" XP002317317 Database accession no. PREV200200010478 cited in the application abstract page 529, column 1, paragraph 2 - page 530, column 1, paragraph 1 page 530, column 1, paragraph 4 - page 531, column 1, paragraph 3 & JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY, vol. 184, no. 2, 15 November 2001 (2001-11-15), pages 161-170, ISSN: 0022-2631 </p>	<p>1, 3, 25, 34</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/012741

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6067859	A	30-05-2000	NONE	
US 4525666	A	25-06-1985	NONE	

PCT/EP2004/012741

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SCHNELLE TH ET AL: "Trapping in AC octode field cages" JOURNAL OF ELECTROSTATICS, Bd. 50, 8. Oktober 1999 (1999-10-08), Seiten 17-29, XP002317314 Gefunden im Internet: URL: http://springerlink.metapress.com/media/C2GVULMXXJEEFB7HWKAK/Contributions/6/Q/L/1/6QL1QR0BJ99RPEG7.pdf 'gefunden am 2005-02-10! in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 17, Absatz 1 - Seite 19, Absatz 1 Seite 20, Zeile 13 - Seite 21, Absatz 1 Seite 21, Absatz 3 - Seite 25, Absatz 2 Abbildungen 1-5</p>	1-3,5-7, 22,25, 27-29
A	<p>MÜLLER K ET AL: "Reversible Electroporabilization of Mammalian Cells by High-Intensity, Ultra-Short Pulses of Submicrosecond Duration" JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY, Bd. 184, 15. Mai 2001 (2001-05-15), - 20. Juli 2001 (2001-07-20) Seiten 161-170, XP002317315 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung</p>	1,25,34
A	<p>ENGELHARDT H ET AL: "Viscoelastic properties of erythrocyte membranes in high-frequency electric fields" NATURE UK, Bd. 307, Nr. 5949, 26. Januar 1984 (1984-01-26), - 1. Februar 1984 (1984-02-01) Seiten 378-380, XP002317316 ISSN: 0028-0836 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung</p>	1-34
A	<p>US 4 525 666 A (GROVES ET AL) 25. Juni 1985 (1985-06-25) Spalte 1, Zeile 5 - Spalte 1, Zeile 10 Spalte 3, Zeile 3 - Spalte 3, Zeile 61 Spalte 4, Zeile 41 - Spalte 4, Zeile 63 Spalte 8, Zeile 50 - Spalte 10, Zeile 3 Abbildung 3</p>	1,25,34

-/-

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 15. November 2001 (2001-11-15), MUELLER K J ET AL: "Reversible electroporabilization of mammalian cells by high-intensity, ultra-short pulses of submicrosecond duration" XP002317317 Database accession no. PREV200200010478 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 529, Spalte 1, Absatz 2 - Seite 530, Spalte 1, Absatz 1 Seite 530, Spalte 1, Absatz 4 - Seite 531, Spalte 1, Absatz 3 & JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY, Bd. 184, Nr. 2, 15. November 2001 (2001-11-15), Seiten 161-170, ISSN: 0022-2631</p> <p>-----</p>	1, 3, 25, 34

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/012741

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6067859	A	30-05-2000	KEINE	
US 4525666	A	25-06-1985	KEINE	